

α -半水硫酸钙骨修复材料修复犬股骨髁缺损的实验研究

陈克伟 周英勇 顾运涛 程少文 孟珠龙 刘建莉 彭磊

摘要 **目的** 研究 α -半水硫酸钙人工骨对犬股骨缺损的修复作用。**方法** 18只健康成年雄性家犬,建立双侧股骨下端骨缺损模型,随机分成3组,每组6只。A组:右侧植入自制 α -半水硫酸钙,左侧植入Osteoset[®]片;B组:右侧植入自制 α -半水硫酸钙,左侧骨缺损处不植入任何材料作为空白对照;C组:右侧骨缺损处不植入任何材料作为对照,左侧植入Osteoset[®]片,分笼饲养,分别于术后4、8、12周处死动物,行大体观察、X线观察、HE染色组织学观察、骨密度检测、骨组织计量分析。**结果** X线观察显示,骨缺损处植入的 α -半水硫酸钙和Osteoset[®]人工骨逐渐降解吸收,被新生的骨组织取代,同期空白对照侧仅在骨缺损边缘处仅见少量新生骨组织。组织学观察显示,各期 α -半水硫酸钙和Osteoset[®]人工骨植入区边缘可见分布密集的骨小梁和较多核深染的骨细胞,而同期空白对照侧缺损处骨小梁较稀疏,骨细胞数量较少。骨密度检测显示,各期两种人工骨植入部位骨密度无明显差别,均明显高于空白对照组。骨组织计量分析显示,各期两种人工骨材料植入区新生骨量无明显差别,但均显著多于同期空白对照组新生骨量。**结论** α -半水硫酸钙人工骨成骨能力与Osteoset[®]人工骨一样,能够修复包容性骨缺损,是一种理想的人工骨植入材料。

关键词 α -半水硫酸钙 人工骨 骨缺损 骨修复

中图分类号 R6 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.04.014

Experimental Study on Repair of Femoral Defects in Dogs with α -Calcium Sulphate Hemihydrate Artificial Bone. Chen Kewei, Zhou Yingyong, Gu Yuntao, et al. Department of Orthopaedics, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To study the effect of α -calcium sulphate hemihydrate artificial bone on the repair of canine femoral defect. **Methods** The model of double lower limb femoral condyle defect, was established with 18 healthy adult male dogs then they were randomly divided into three groups, each with 6. Group A: the self-made α -calcium sulphate hemihydrate was implanted in the right femur, Osteoset[®] was implanted in the left femur; Group B: the self-made α -calcium sulphate hemihydrate was implanted in the right femur, and left femur implanted into nothing, as blank control group. Group C: the right side of the femur was not implanted in any material as a blank control group, Osteoset[®] was implanted in the left side of the femur. Animals were assigned to the cage breeding alone. After 4 weeks, 8 weeks, 12 weeks, the animals were killed, the materials were taken out for general observation, X-ray observation, HE staining histological observation, bone density measurement. **Results** X-ray observation results showed that in the bone defect, the α -calcium sulphate hemihydrate and Osteoset[®] artificial bone were gradually degraded and absorbed, which was replaced by the new bone tissue. At the same time, only a small amount of newly formed bone tissue was seen at the edge of the blank control group. Histological observation showed that in the edge of the α -calcium sulphate hemihydrate and Osteoset[®] artificial bone implant area, there were dense distribution of trabecular bone and many nuclear hyperchromatic bone cells were found. While in the same period, the trabecular bone was more sparse and the number of bone cells was less in the blank control side. Bone mineral density detection results showed that the bone mineral density of the two kinds of artificial bone implant area were significantly higher than the blank control group. Bone tissue measurement analysis showed that the number of newly formed bone had no significant difference in the region of artificial bone implantation, but it was significantly more than that in the control group. **Conclusion** The treatment of delayed union and nonunion of tibial fracture by percutaneous autologous bone marrow transplantation is satisfactory, and it is worthy of clinical application.

Key words α -Calcium sulphate hemihydrate; Artificial bone; Bone defect; Bone repair

基金项目:浙江省科技计划项目(2010C34006);海南省自然科学基金资助项目(514216);海南省科技合作专项基金资助项目(KJHZ2015-05)

作者单位:325000 温州医科大学附属第二医院骨科(陈克伟、周英勇、顾运涛、彭磊);570102 海口,海南医学院附属医院创伤中心(程少文、孟珠龙、刘建莉、彭磊)

通讯作者:彭磊,电子邮箱:xiaobo197518@163.com

我国每年各种原因导致骨缺损急需植骨的患者高达数百万人^[1]。一直以来自体骨移植被视为骨缺损修复的金标准,但其局限性也很明显,供体来源少,易引起创伤、疼痛、感染等并发症,使其在临床广泛应用受到限制^[2-4]。20 世纪 90 年代,美国 Wright 公司生产的硫酸钙人工骨 Osteoset® 被美国 FDA 批准应用于临床,其具有生物相容性好、降解速度适宜、强度高、来源广泛、灭菌保存方便等优点。为了实现硫酸钙人工骨的国产化,本研究通过前期大量的工作,发明了一种新的 α -半水硫酸钙制备工艺,改变了 α -半水硫酸钙粉体的晶体形貌,使其固化后的降解速度、生物学性能得到改善提高。通过前期组织相容性等研究,初步证明笔者制备的 α -半水硫酸钙样品具有良好的组织相容性及生物安全性,本研究进一步通过大动物骨内植入实验,对其成骨能力、生物力学性能等进行评价,为后期临床应用提供依据。

材料与方法

1. 材料:以海南省创伤与灾难救援重点实验室前期研究结果为依据,按 1:0.35 固液比,称取 α -半水硫酸钙粉末 2g,移液器取去离子水 0.7ml,两者置培养皿中充分搅拌混匀成黏稠胶浆状,将胶浆置于直径 5mm 的圆形模具中,待 α -半水硫酸钙固化后取出,即可得到 α -半水硫酸钙人工骨样品颗粒,⁶⁰Co 伽马射线辐照灭菌备用。

2. 试验方法:(1)动物分组:18 只健康成年雄性家犬,体重 7.5~8.5kg,建立双侧股骨下端骨缺损模型后编号,将其随机分成 3 组,每组 6 只,A 组:右侧植入自制的 α -半水硫酸钙片,左侧植入 Osteoset® 片;B 组:右侧植入自制的 α -半水硫酸钙片,左侧骨缺损处不植入任何材料作为空白对照;C 组:右侧骨缺损处不植入任何材料作为对照,左侧植入 Osteoset® 片,分笼饲养,分别于术后 4、8、12 周处死动物,行大体观察、X 线观察、HE 染色组织学观察以及骨密度检测。(2)手术过程:家犬称重,3%戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉(1ml/kg)。常规后肢备皮,消毒,铺无菌洞巾,选大腿外侧下端近膝关节处切口,长约 2cm,暴露股骨外侧干骺端,避开骨骺线,确定膝关节外侧副韧带起点外侧离股骨下端关节面约 4~5mm 处为钻孔点,平行膝关节面,以骨科电钻由外向内钻一直径 5mm、深度 10mm 圆柱型骨缺损^[5]。生理盐水多次冲洗伤口后按实验设计分别植入自制的 α -半水硫酸钙人工骨、Osteoset® 片,空白对照组不植入任何材料,再次碘伏消毒创口,逐层缝合皮下组织、皮

肤,无菌敷料包扎伤口。80 万 U 青霉素肌内注射预防感染。

3. 观察指标及方法:(1)大体观察:术后每日观察动物进食、活动、精神状态。观察记录伤口有无红肿、渗液、脓肿等感染表现。取标本时观察手术植骨周围有无炎性反应、人工骨吸收及骨痂生长情况。(2)X 线检查:分别于术后 4、8、12 周各处死两只动物,取材后拍摄股骨下端缺损区正侧位片,了解人工骨材料吸收降解及新骨形成、骨缺损修复等情况。(3)骨密度测定:使用双能骨密度测定仪对股骨干骺端进行扫描,测定实验组、对照组股骨干骺端及骨缺损区骨密度,了解人工骨材料吸收及新骨形成后骨密度变化情况。(4)组织学检查:动物处死后获取双侧股骨标本,在距股骨远端关节面上方 3cm 处截断股骨,10% 甲醛溶液固定,常规制作切片,在显微镜不同放大倍数下观察组织、细胞形态。(5)骨组织计量学分析:HE 染色后,每组切片中随机选取 3 张,在普通光镜下每张切片随机选取 3 个视野(200 倍),使用 Image pro-Plus8.0 显微图像分析软件,测量记录各组切片中骨缺损部位每 1mm² 新生骨面积(mm²)占缺损区面积比。

4. 统计学方法:数据统计学处理应用 SPSS 19.0 软件进行,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验进行数据分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 大体观察:术后 4~6h 后恢复进食水,24h 后可站立行走,未发生动物死亡,未出现骨折等异常情况,手术伤口未出现红肿、渗出等炎症征象,均一期愈合恢复正常,伤口缝线自动脱落。

2. X 线检查:术后 4 周可见, α -半水硫酸钙组和 Osteoset® 组植入材料边缘有新生骨痂生成,骨材料与骨组织界线模糊不清,植入材料大致轮廓影仍可辨别,骨材料边缘有少量降解吸收而变圆润;空白对照组骨缺损处未见明显骨痂形成,圆柱形缺损轮廓稍变圆润。术后 8 周, α -半水硫酸钙组和 Osteoset® 组植入材料边缘的新生骨量较 4 周明显增多,新生骨密度较前增高,骨材料较前明显吸收减少;空白对照组骨缺损轮廓仍可见,较 4 周稍模糊,边缘可见少量骨组织生成。术后 12 周, α -半水硫酸钙组和 Osteoset® 组植入材料完全降解吸收,骨缺损部位被新生骨组织代替,新生骨密度稍低于周边正常骨组织,原骨缺损孔边界无法辨别;空白对照组骨缺损轮廓较前模糊,



图 1 各组不同时间点 X 线片

A、B、C. 分别为 4、8、12 周 α -半水硫酸钙组 X 线结果;D、E、F. 分别为 4、8、12 周 Osteoset[®]组 X 线结果;

G、H、I. 分别为 4、8、12 周空白对照组 X 线结果;L. 左侧;R. 右侧

边缘有部分骨组织生成,仍能分辨出其大部分低密度透亮区。

3. 骨密度测定:从表 1 可以看出,各个时期两种人工骨植入部位骨密度均明显高于空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);各期 α -半水硫酸钙组、Osteoset[®]组骨缺损区骨密度比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),由此可以认为自制 α -半水硫酸钙人工骨修复能力与 Osteoset[®]组相近。

表 1 骨缺损区骨密度变化 ($\bar{x} \pm s, g/cm^2$)

组别	4 周	8 周	12 周
空白对照组	0.083 ± 0.013	0.122 ± 0.024	0.194 ± 0.043
α -半水硫酸钙组	$0.453 \pm 0.051^*$	$0.293 \pm 0.045^*$	$0.341 \pm 0.052^*$
Osteoset [®] 组	$0.446 \pm 0.045^*$	$0.274 \pm 0.035^*$	$0.316 \pm 0.063^*$

与空白对照组比较, * $P < 0.05$

4. 组织学检查:术后 4 周, α -半水硫酸钙组和

Osteoset®组植入区边缘组织中可见少量稀疏的新生骨小梁,可见成软骨细胞,而空白对照组基本没有新生骨小梁。术后 8 周, α -半水硫酸钙组和 Osteoset®组切片中可见新生骨小梁较 4 周时明显增多,可见较多软骨细胞,并趋于成熟,空白对照组可见少量新生

骨小梁及成软骨细胞。术后 12 周, α -半水硫酸钙组和 Osteoset®组骨小梁结构更多,结构更为致密成熟,可见成熟的骨细胞,空白对照组骨小梁明显少于前两组。各期 α -半水硫酸钙组和 Osteoset®组骨小梁密度、结构及骨细胞数量比较,差异无统计学意义。

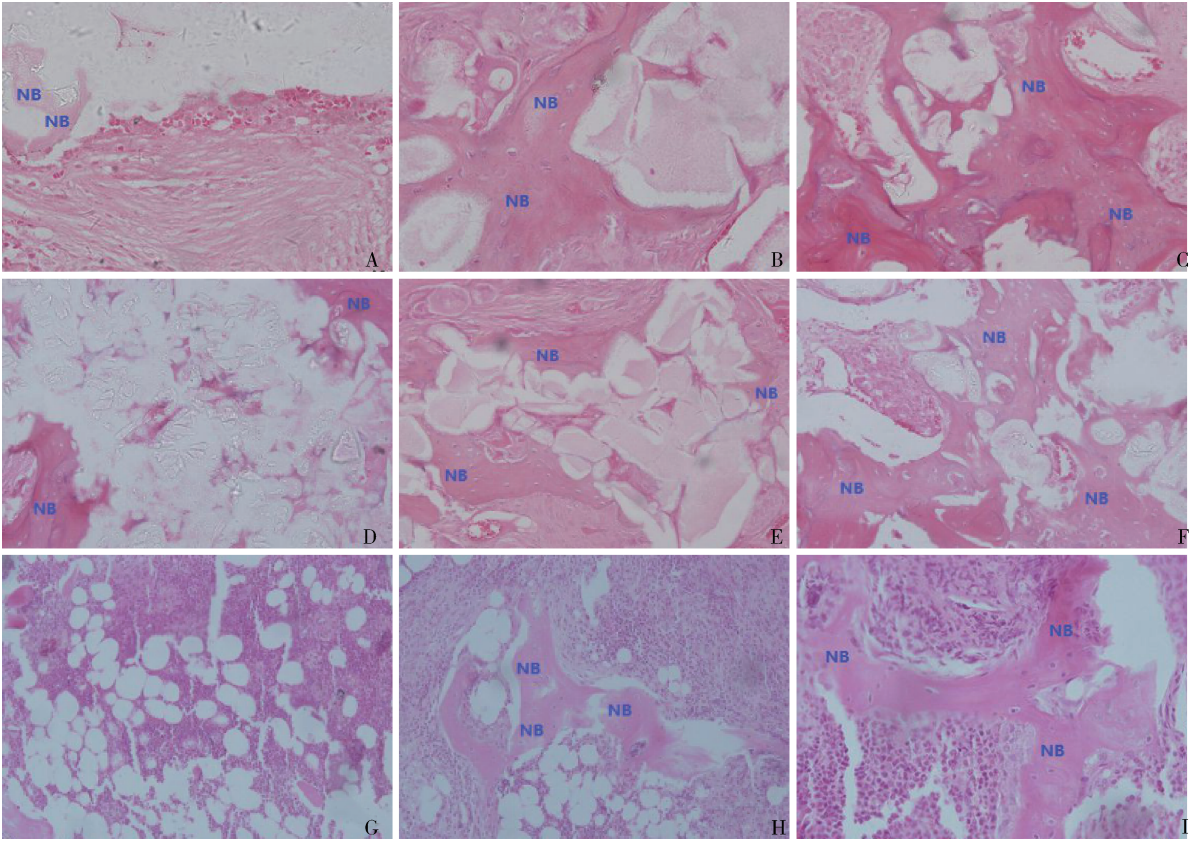


图 2 各组不同时间点组织学改变(HE 染色,×200)

A、B、C. 分别为 4、8、12 周 α -半水硫酸钙组 HE;D、E、F. 分别为 4、8、12 周 Osteoset®组;
G、H、I. 分别为 4、8、12 周空白对照组

5. 骨组织量学分析:从表 2 可以看出,4、8、12 周时 α -半水硫酸钙组、Osteoset®组骨缺损区新生骨组织面积逐渐增加,两组新生骨量均显著多于同期空白对照组差异有统计学意义($P < 0.05$);而各期 α -半水硫酸钙组、Osteoset®组骨缺损区新生骨量差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 骨缺损区新生骨面积占比 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	4 周	8 周	12 周
空白对照组	—	18.3 ± 1.9	29.6 ± 2.2
α -半水硫酸钙组	16.5 ± 1.8 *	31.2 ± 2.1 *	40.6 ± 2.0 *
Osteoset®组	16.7 ± 2.3 *	30.9 ± 1.9 *	40.8 ± 1.7 *

与空白对照组比较,* $P < 0.05$

讨 论

骨缺损的修复重建过程十分复杂,是骨组织的再生重塑过程,该过程包含骨骼结构及功能的重建,骨缺损的治疗过程中,骨修复材料的选择非常重要,与临床治疗效果密切相关,是骨缺损治疗的关键一环^[6]。骨修复材料对植骨部位的修复机制主要包括骨生成、骨诱导及骨传导 3 个方面的作用^[7,8]。有研究认为,潜在的骨诱导性对硫酸钙成骨作用有帮助,其可能的机制为:硫酸钙人工骨材料植入机体后逐渐降解,释放出钙离子,在局部形成高钙离子微环境,与弱酸环境协同诱导刺激成骨相关因子的释放,而且可能诱导 mRNA、骨细胞受体 (FGFR1)、BMP - 1、BMP - 7 等成骨相关基因及细胞因子的表达,进而促

进骨髓间充质干细胞(BMSCs)向成骨细胞分化,并促进毛细血管向骨材料孔隙延伸,加速新骨的生成^[9-12]。

硫酸钙作为一种优良的骨移植材料在临床上已使用很长时间,早在1892年Dreesmann等^[13]就首先报道了他们应用煅烧硫酸钙人工骨成功治疗多例结核、骨髓炎、肿瘤所致骨缺损的病例,这些报道引起了学术界的注意,后来大量研究人员开展了与硫酸钙人工骨相关的基础与临床工作^[14]。20世纪90年代,美国Wright公司生产的硫酸钙人工骨Osteoset[®]被美国FDA批准应用于临床,其具有生物相容性好、降解速度适宜、强度高、来源广泛、灭菌保存方便等优点。2001年Turner等^[15]利用Osteoset[®]片开展动物实验,将其植入狗的一侧肱骨松质骨内,同时设置自体松质骨组和空白对照组,不同时期X线、组织学检查结果显示,Osteoset[®]组缺损区新生骨组织的量是空白对照组的4倍,而自体松质骨组与Osteoset[®]组比较成骨量差异性不明显,同时发现硫酸钙人工骨已经完全降解吸收,骨缺损区填充的新生骨组织结构与周围正常骨质无区别,也没有发现炎症反应。

硫酸钙作为骨移植材料存在一些缺陷:①在体内降解速度比新骨生成的速度快,在体内不同部位降解吸收时间不完全相同,一般为30~72天;②骨材料固化后力学强度不够,不能为目标修复区域提供足够的力学支撑;③修复初期,骨材料难以与周围正常骨组织紧密结合,显示其生物活性较弱。研究也表明,具有均一的细小等轴晶粒的 α -半水硫酸钙表现出适中的降解速率、优良的力学性能和良好的生物性能,因此改进 α -半水硫酸钙的生产工艺,实现对 α -半水硫酸钙晶粒尺寸和形貌的可控制备成为关键技术。笔者通过前期大量的工作,发明了一种新的 α -半水硫酸钙制备工艺,其关键是通过在反应过程中加入丁二酸及无水乙醇,控制温度、浓度、时间、酸碱度等参数,对 α -半水硫酸钙进行改性,改变其晶体形貌,使其固化后的降解速度、力学性能、生物学性能等得到明显改善^[16]。

本实验验证了笔者自制 α -半水硫酸钙具有优异的骨修复能力和生物力学性能,并且在降解吸收、成骨性能等方面与Osteoset[®]差别不大,可以作为一

种良好的植骨材料进一步深入研究,为以后大规模临床应用奠定了基础。

参考文献

- 田丰, 成国祥, 刘长军, 等. 骨组织损伤修复生物医用材料的研究进展[J]. 医疗卫生装备, 2005, 26(2): 22-23
- Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation[J]. Spine, 1995, 20(9): 1055-1060
- Hill NM, Geoffrey HJ, Devane PA. Donor site morbidity in the iliac crest bone graft. [J]. Australian & New Zealand J Surg, 1999, 69(10): 726-728
- Lerner T, Griefingholt H, Liljenqvist U. Bone substitutes in scoliosis surgery[J]. Der Orthopäd, 2009, 38(2): 181-188
- Cheng N, Daij, Cheng X, et al. Porous CaP/silk composite scaffolds to repair femur defects in an osteoporotic model [J]. J Mater Sci, 2013, 24(8): 1963-1975
- Lee SC, Shea M, Battle MA, et al. Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by RhBMP-2 in PLGA matrix[J]. J Biomed Mater Res, 1994, 28(10): 1149-1156
- Costantino PD, Friedman CD. Synthetic bone graft substitutes[J]. Otolaryngol Clin North Am, 1994, 27(5): 1037-1040
- Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing [J]. Foot Ankle Surg, 1996, 35(5): 413-417
- 李赛, 汤逊. 硫酸钙骨诱导机制的研究进展[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2012; 6: 28-30
- Gaasbeek RDA, Rijnberg WJ, Loon CJMV, et al. No local recurrence of enchondroma after curettage and plaster filling[J]. Archi Orthopaed Trauma Surg, 2005, 125(1): 42-45
- Dasmah A, Sennerby L, Rasmusson L, et al. Intramembraneous bone tissue responses to calcium sulfate: an experimental study in the rabbit maxilla[J]. Clin Oral Implants Res, 2011, 22(12): 1404-1408
- Palmieri A, Pezzetti F, Brunelli G, et al. Calcium sulfate acts on the miRNA of MG63E osteoblast-like cells[J]. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater, 2008, 84(2): 369-374
- Dreesmann H. Ueber knochenplombierung[J]. bietr kin chir, 1892, (9): 804-810
- Hogset OB. Plaster of paris: Thermal properties and biocompatibility [J]. Acta Otolaryngol, 1986, 101: 445-452
- Turner TM, Urban RM, Gitelis S, et al. Radiographic and histologic assessment of calcium sulfate in experimental animal models and clinical use as a resorbable bone-graft substitute, a bone-graft expander, and a method for local antibiotic delivery. One institution's experience[J]. J Bone Joint Surg, 2001, 83-A Suppl 2(Pt 1): 8-18
- 徐华梓, 黄庆, 楼毅, 等. 一种医用 α -半水硫酸钙人工骨修复材料及其制备方法[P]. 中国专利, 102390941A, 2012-03-28

(收稿日期: 2016-08-22)

(修回日期: 2016-09-07)